

分类号_____

密级_____

U D C_____

编号_____

厦 门 大 学

博 士 后 研 究 工 作 报 告

黑鲷 hepcidin 抗菌肽不同基因变体的

表达特性及其抗菌活性研究

杨 明

工作完成日期 2006 年 7 月—2008 年 5 月

报告提交日期 2008 年 6 月

厦 门 大 学

2008 年 6 月

黑鲷 hepcidin 抗菌肽不同基因变体的
表达特性及其抗菌活性研究

**Characterization of gene expression and antimicrobial activity of
hepcidin variants AS-hepc2 and AS-hepc6 in black porgy
(*Acanthopagrus schlegelii* B.)**

博 士 后 姓 名 杨 明

流动站（一级学科）名称 厦门大学环境科学与工程

专 业（二级学科）名称 环境科学

研究工作起始时间 2006 年 7 月 25 日

研究工作期满时间 2008 年 7 月 11 日

厦 门 大 学

2008 年 6 月

厦门大学博士后研究工作报告著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用博士后研究工作报告的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交该报告的纸质版和电子版，有权将该报告用于非赢利目的的少量复制并允许该报告进入学校图书馆被查阅，有权将该报告的内容编入有关数据库进行检索，有权将博士后研究工作报告的标题和摘要汇编出版。保密的博士后研究工作报告在解密后适用本规定。

本研究报告属于：1、保密（ ），2、不保密（ ）

纸本在 年解密后适用本授权书；

电子版在 年解密后适用本授权书。

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

中文摘要

Hepcidin 的一类富含半胱氨酸、性质独特的抗菌肽，在鱼类中分布广泛。本论文以我国海水养殖黑鲷中分离到的 2 个 hepcidin 基因变体——AS-hepc2 基因和 AS-hepc6 基因为研究对象，较深入的分析了这两个基因变体在黑鲷多器官、组织中的表达特性，并通过原核表达系统表达重组蛋白，分析其抗菌谱和抗菌活性，为阐明黑鲷 hepcidin 不同基因变体的生物学意义、深入研究鱼类 hepcidin 的非特异性免疫机制奠定基础。同时，建立的表达和纯化重组 hepcidin 抗菌肽的方法，可为将来开发利用海水养殖鱼类抗菌肽，研制新型的可替代抗生素的有效抗耐药性细菌药物或饲料免疫添加剂等提供科学依据。

通过研究工作获得了如下结果：

1 应用荧光定量 RT-PCR 方法，揭示了 AS-hepc2 基因和 AS-hepc6 基因在黑鲷多器官、组织中的表达具有时间、空间和表达方式的不同：

(1) AS-hepc2 和 AS-hepc6 基因变体在健康黑鲷中的表达存在器官、组织表达特异性。AS-hepc2 基因和 AS-hepc6 基因在肝脏、脾脏、头肾、后肾、心脏、胃、肠、鳃、脑、皮肤中都有表达，但是 AS-hepc2 在肝脏中的表达量最高，而 AS-hepc6 基因在头肾和后肾中的表达量最高。

(2) AS-hepc2 和 AS-hepc6 基因变体在对细菌注射诱导的响应上有明显的不同。在细菌注射后，AS-hepc2 基因的相对表达量在肝脏、脾脏、后肾、胃和鳃组织中有显著性升高；AS-hepc6 基因的相对表达量在肝脏、脾脏、血细胞和鳃组织中有显著性升高；从相对表达量上，肝脏是 AS-hepc2 基因总表达量升高的主要贡献者，而血细胞和脾脏是 AS-hepc6 基因总表达量升高的主要贡献者。

(3) 在健康黑鲷的肝脏和血细胞中，AS-hepc6 基因的本底绝对拷贝数大大高于 AS-hepc2 基因本底拷贝数。细菌感染后，在黑鲷肝脏中，AS-hepc2 基因拷贝数升高到与 AS-hepc6 基因拷贝数的基本持平；而在血细胞中，AS-hepc6 基因的拷贝数仍然占有绝大的比率。

2 根据已经获得的黑鲷 AS-hepc2 和 AS-hepc6 的 cDNA 序列, 分别构建了 pTrc-CKS/AS-hepc2 和 pTrc-CKS/AS-hepc6 融合表达载体, 在大肠杆菌中经 IPTG 诱导后可分别表达 rAS-hepc2 和 rAS-hepc6 重组蛋白。rAS-hepc2 在超声波破碎菌体后以可溶蛋白和包涵体两种形式存在, 而 rAS-hepc6 主要以包涵体存在。将 rAS-hepc2 可溶上清和 2M 尿素可溶包涵体以及 rAS-hepc6 包涵体复性蛋白分别进行金属螯合亲和层析, 可纯化出融合表达蛋白。rAS-hepc2 融合蛋白在 P3C 酶切反应后再次进行亲和层析, 可纯化出 rAS-hepc2 酶切片段。

对 9 种细菌测定的最小抑菌浓度 (MIC) 结果显示: rAS-hepc2 和 rAS-hepc6 融合蛋白 P3C 酶切后混合物 (最高测试浓度分别为 50 μM 和 30 μM) 能够抑制金色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、溶壁微球菌、枯草芽孢杆菌、谷氨酸棒杆菌、嗜水气单胞菌和副溶血弧菌的生长, 对溶壁微球菌和嗜水气单胞菌 MIC 最低 (分别为 1.56-3.13 μM 和 1.9-3.7 μM), 但是对蜡状芽孢杆菌和大肠杆菌鉴定株的生长都无抑制作用。

对 6 种细菌和 3 种真菌测定的 MIC 结果显示: rAS-hepc2 未酶切融合蛋白 (最高测试浓度分别为 50 μM) 能够抑制金色葡萄球菌、溶壁微球菌、枯草芽孢杆菌和谷氨酸棒杆菌的生长, 对溶壁微球菌的 MIC 最低 (0.78-1.56 μM), 但是对蜡状芽孢杆菌、大肠杆菌鉴定株、禾谷镰孢、腐皮镰孢、黑曲霉的生长都无抑制作用; 二次纯化所得 rAS-hepc2 酶切片段 (最高测试浓度分别为 50 μM) 在抗菌谱和抗菌活性上均小于 rAS-hepc2 未酶切融合蛋白, 只对金色葡萄球菌、溶壁微球菌的生长有抑制作用。

关键词: Hepcidin; 基因表达; 重组蛋白; 抗菌活性; 黑鲷

Abstract

Hepcidin is a cysteine-rich antimicrobial peptide and putative iron hormone previously described in mice and humans. Dozens of fish hepcidins have been isolated and characterized so far. In our earlier study we reported the isolation of seven hepcidin gene variants AS-hepc1-7 from the normal black porgy. Here we characterized the expression profiles of AS-hepc2 and AS-hepc6 gene variants in normal and bacterial challenged black porgy using the real time RT-PCR method. To determine the in vitro antimicrobial activity of AS-hepc2 and AS-hepc6, two recombinant pTrc-CKS vectors were constructed and the recombinant proteins were expressed in *Escherichia coli*. The purified rAS-hepc2 and rAS-hepc6 proteins then were used for analysis of the antimicrobial activities. The study indicated that two hepcidin variants of black porgy showed different expression patterns to bacterial challenge and might have different functions in vivo against invading microorganisms. The results are showed as follows:

1 Characterization of gene expression of AS-hepc2 and AS-hepc6 gene variants using the real time RT-PCR method:

(1) In normal fish, the transcripts of AS-hepc2 and AS-hepc6 were both detected in all tested tissues, including the liver, spleen, head kidney, kidney, heart, brain stomach, intestine, gill, blood cells and skin. But AS-hepc2 was predominantly expressed in the liver and AS-hepc6 was highly expressed in the head kidney and kidney.

(2) Following bacterial challenge, AS-hepc2 was significantly induced in the liver, kidney, spleen, stomach and gill, while AS-hepc6 was significantly induced in the liver, spleen, blood cells and gill. Results of the relative contribution of tissues for gene expression showed that liver was almost exclusively responsible for the AS-hepc2 expression in normal and bacterially challenged fish, but for AS-hepc6, head kidney and kidney were the main contributors of the background expression in normal fish, and blood cells and spleen were both responsible for the up-regulated expression in bacterially challenged fish.

(3) In normal fish liver and blood cells, the absolute quantity of the background AS-hepc6 mRNA transcripts was much higher than the AS-hepc2 mRNA transcripts. Following bacterial challenge, AS-hepc2 was highly induced in the liver and the level of AS-hepc2 expression was nearly equal to the AS-hepc6 expression; however, in the bacterial challenged blood cells, the level of AS-hepc6 expression remained predominant comparing to the AS-hepc2 expression.

2 To characterize the in vitro antimicrobial activity of AS-hepc2 and AS-hepc6, two recombinant pTrc-CKS vectors harboring the As-hepc2 or AS-hepc6 cDNA sequence encoding hepcidin prodomain and mature peptide were constructed, and rAs-hepc2 and rAS-hepc6 fusion proteins with an N-terminal fusion protein and a C-terminal hexahistidine tag were then expressed in *Escherichia coli* with IPTG induction. The rAS-hepc2 fusion protein was expressed in the soluble fraction and in the inclusion bodies of the crude bacterial lysate with sonication, while rAS-hepc6 was mainly expressed in the inclusion bodies. The soluble fraction and resolved inclusion bodies in 2M urea solution of the rAs-hepc2 fusion protein, and the refolded inclusion bodied of rAs-hepc6, were purified from the total bacterial protein using Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC). Then, the digested rAs-hepc2 fragment was purified from the mixed products of the rAS-hepc2 fusion protein following 3C protease digestion using IMAC.

The mixed products of the rAS-hepc2 following 3C protease digestion were used to assay antibacterial activity. The minimum inhibitory concentration (MIC) of recombinant AS-hepc2 and AS-hepc6 was determined to nice bacterial strains. The rAS-hepc2 and rAS-hepc6 proteins were both active against Gram-positive bacteria, viz. *Micrococcus lysodeikticus*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis* except *B. cereus* and Gram-negative *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio parahaemolyticus* (fish-pathogenic bacteria), except *E. coli* at the highest concentration tested (50 μ M and 30 μ M, respectively). *M. lysodeikticus* and *A. hydrophila* were the species more susceptible to the recombinant AS-hepcidin proteins (1.56-3.13 μ M and 1.9-3.7 μ M, respectively).

The MIC of the undigested rAs-hepc2 fusion protein and digested rAs-hepc2 fragment after 3C protease digestion was determined to six bacterial strains and there fungi. The undigested rAs-hepc2 fusion protein was active against Gram-positive bacteria, viz. *M. lysodeikticus*, *S. aureus*, *C. glutamicum*, *B. subtilis* except *B. cereus*, but was not active against Gram-negative *E. coli* and fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium graminearum* and *F. solani* at the highest concentration tested (50 μ M). *M. lysodeikticus* was the species more susceptible to the undigested rAs-hepc2 protein (0.78-1.56 μ M). The digested rAs-hepc2 fragment was less active against bacterial strains than the undigested rAs-hepc2 fusion protein, and it was just active against *M. lysodeikticus* and *S. aureus*.

Keywords: Hepcidin gene; Gene Expression; Recombinant protein; Antimicrobial activity; *Acanthopagrus schlegelii*

目 录

中文摘要	B-1
英文摘要	B-3
第一章 绪论	1
第二章 黑鲷hepcidin抗菌肽基因变体Hepc2和Hepc6体内表达特性的研究.....	8
第一节 材料与方法.....	8
1.1 材料.....	8
1.2 实验方法... ..	11
第二节 结果.....	14
2.1 总RNA的提取	14
2.2 AS-hepc2和AS-hepc6的相对扩增曲线.....	14
2.3 健康黑鲷各器官、组织中AS-hepc2和AS-hepc6的表达特性.....	15
2.4 细菌感染黑鲷各器官、组织中 AS-hepc2 的表达特性.....	16
2.5 细菌感染黑鲷各器官、组织中AS-hepc6的表达特性.....	18
2.6 细菌感染黑鲷中AS-hepc2和AS-hepc6基因表达特性的比较分析...19	
2.7 黑鲷肝脏和血细胞中 AS-hepc2 和 AS-hepc6 基因的绝对定量.....	22
第三节 讨论.....	23
3.1 实时荧光定量 PCR 分析基因差异表达.....	23
3.2 黑鲷AS-hepc2和AS-hepc6基因变体的基因表达差异分析.....	23
第三章 AS-hepc2 和 AS-hepc6 基因变体的原核表达、表达产物的纯化及其抗菌活性的测定.....	26
第一节 材料与方法.....	26
1.1 材料.....	26
1.2 实验方法.....	30
第二节 结果.....	44
2.1 预连接 pTrc-CKS 表达载体、AS-hepc2、AS-hepc6 目的 cDNA 片段的制备.....	39
2.2 pTrc-CKS/AS-hepc2 和 pTrc-CKS/AS-hepc6 表达载体的鉴定及测序	39

2.3 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达.....	40
2.4 rAS-hepc2 和 rAS-hepc6 融合表达产物的纯化.....	42
2.5 纯化表达产物的脱盐及酶切.....	42
2.6 rAS-hepc2 和 rAS-hepc6 融合表达产物的鉴定.....	42
2.7 hepcidin 原核表达蛋白抗菌活性的测定.....	44
第三节 讨论.....	46
3.1 AS-hepc2 和 AS-hepc6 基因融合表达载体的构建及表达产物的纯化	46
3.2 AS-hepc2 和 AS-hepc6 基因原核表达产物的抗菌活性.....	47
结语.....	49
参考文献.....	51
附录.....	56
在站期间参加的科研项目及成果.....	C-1
致谢	

第一章 综述

近海海洋环境中抗生素污染的问题是目前影响我国海水养殖业可持续健康发展的重大问题,由此引起的违禁抗生素残留已经成为制约我国养殖水产品出口创汇的瓶颈,国际上如德国、法国等欧盟发达国家已制定出相关法律条文禁止养殖业滥用抗生素以及残留抗生素的水产品进口和销售(邵望予, 2005)。而养殖环境中抗生素的污染也对多种海洋生物造成不良影响,严重制约海水养殖业的健康发展(李传伦和朱清贤, 1999; 李兆新, 2000)。因此,寻找能够替代抗生素的预防药物和研制环保型饲料免疫添加剂,消除并最终淘汰抗生素在我国海水养殖业的大量应用,从而避免水产品与养殖水环境中抗生素的污染,是我国未来海水养殖业高效、健康发展的迫切需求。

迄今在海洋动物发现的天然免疫因子中最值得注目的是抗菌肽,近年来科学家将这些具有抗微生物特性的肽类称为“天然抗生素”。抗菌肽(Antimicrobial Peptides, AMP)是一类具有广谱抗微生物活性的短肽的总称,是天然免疫系统的重要组成部分(Hancock & Scott, 2000; Hancock & Diamond, 2000)。1981年瑞典科学家 Steiner *et al* (1981)最早从惜古比天蚕(*Hyatophora cecropia*)蛹中诱导分离得到一种具有杀菌活性的短肽,并将其命名为 Cecropin。此后人们不断的从高等脊椎动物、低等脊椎动物、无脊椎动物乃至植物中分离到各种具有抗菌活性的短肽(Vizioli & Salzet, 2002)。近几年,有关水生生物中抗菌肽的研究日渐重视,抗菌肽被认为是鱼、虾、贝等非特异性免疫防御系统的主要成分之一,在防御海水性细菌和病毒入侵方面起着重要作用。

抗菌肽的作用机理不同于传统抗生素,主要依赖于其独特的两亲性二级结构,能选择性地作用于细菌外层细胞膜的某些组分,破坏膜的稳定性并产生穿孔现象,从而增大其渗透性以杀死或抑制细菌的生长(Hancock & Lehrer, 1998)。抗菌肽相对分子量较小,热稳定和水溶性好,使用后对细菌不产生耐药性,且进入机体后无有害残留。当机体遭遇微生物入侵时,这种小分子量多肽极易扩散到感染部位,作用于原核细胞和发生病变的真核细胞,而对真核细胞几乎没有毒副作用(周庆军等, 2002)。因此,抗菌肽在养殖鱼类上的研究与应用,将是实现

海水养殖鱼类健康养殖、消除抗生素污染的重要措施 (Roch, 1999; 叶星和白俊杰, 2000)。抗菌肽使人们看到了解决细菌耐药性这一世界难题的希望 (Hancock & Lehrer, 1998)。为寻找传统抗生素的替代品, 近几年对抗菌肽的应用研究已成为医学、陆生和水生动植物等领域的研究热点。

1. 国内外 hepcidin 的研究进展

Hepcidin 是近年发现的一类富含半胱氨酸、具有二硫键结构的性质独特的多肽 (Verga-Falzacappa & Muckenthaler, 2005)。迄今对其的研究主要集中在人、鼠、猪等高等哺乳动物以及低等的脊椎动物鱼类中。2000 年, Krause *et al* 首先从人 (*Homo sapiens*) 血液中分离纯化了这一多肽, 称之为肝脏表达的抗菌多肽 (liver expressed antimicrobial peptide, LEAP1); 2001 年 Park 等从人尿液中再次分离出这种来源于肝的富含半胱氨酸的抗菌肽, 首先命名为 hepcidin。2002 年 Shike *et al* 最早报道从杂交斑纹鲈鱼 (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) 的鳃中分离得到 hepcidin 的成熟肽。而 hepcidin 的 mRNA 序列也从多种生物 (特别是鱼类) 中通过克隆得到或通过 EST 获得, 其中包括小鼠 (*Mus musculus*) (Pigeon *et al*, 2001)、大鼠 (*Rattus norvegicus*)、青鳉 (*Oryzias latipes*)、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)、牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) (Inoue *et al*, 1997)、美洲鲈 (*Pleutonectes americanus*)、大西洋鲑鱼 (*Salmo salar*) (Douglas *et al*, 2003)、鰕虎鱼 (*Gillichthys mirabilis*) (Gracey *et al*, 2001)、花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) (王克坚等, 2004; Ren *et al*, 2006)、斑马鱼 (*Danio rerio*) (Shike *et al*, 2004)、真鲷 (*Pagrus major*) (Chen *et al*, 2005; 杨明等, 2006)、大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) (Chen *et al*, 2007) 和黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*) (Yang *et al*, 2007) 等, 表明 hepcidin 广泛存在于多种鱼类中。

1.1 hepcidin 基因家族的特点

Hepcidin 是一个在成熟肽 C 末端八个保守位点上富含半胱氨酸残基的抗菌肽家族, 该组成特点在不同生物来源的 hepcidin 中具有高度的保守性。完整的 Hepcidin 基因的氨基酸序列由三部分组成: 信号肽 (signal peptide)、优势域

(prodomain) 和成熟肽 (mature peptide)。

人类hepcidin在合成过程中, 首先产生一个由84个氨基酸组成的早期多肽, 然后被降解形成含有60个氨基酸组成的前体肽, 最后从单一的前体肽生成具有生物活性的多肽分子 (Krause *et al*, 2000; Park *et al*, 2001)。人只有一个拷贝的hepcidin基因, 但是由于N端成熟肽的切割位点不同, 分成20个氨基酸的hepcidin-20和25个氨基酸的。在小鼠中的报道却有两个不同的hepcidin基因(hepc1和hepc2)存在 (Pigeon *et al*, 2001; Nicolas *et al*, 2001; Ilyin *et al*, 2003)。与hepc2相比, hepc1与人的更相近, 人的hepc-25与hepc1有76%的同源性, 而与hepc2只有58%。迄今, 已知人hepcidin基因位于第19号染色体上, 而小鼠hepcidin基因位于第7号染色体上。人、大鼠、小鼠和几种鱼类hepcidin的基因结构极为相似, 基因都含有三个外显子和两个内含子, 转录后的mRNA长约为0.4kb。

Hepcidin 在人类和大鼠 (Pigeon *et al*, 2001) 中只有一个 hepcidin 基因被确认, 在小家鼠的基因组中却发现两个成熟肽一致度为 68% 的 hepcidin 基因。但是 hepcidin 多变体现象在鱼类中似乎很普遍, 例如在白鲈 (Shike *et al*, 2002) 和斑马鱼 (Shike *et al*, 2004) 的研究中都分别发现两种相似的 hepcidin 变体。而 Douglas *et al* (2002) 通过对几种海水鱼 EST 数据库和 dbEST 数据库的详尽查找, 也发现了 22 条以前还未被证实的类似 hepcidin 的序列分别来自牙鲆, 青鲈, 美洲鲈和大西洋鲈鱼。同时, 在日本比目鱼 (Hirono *et al*, 2005)、日本鲈鱼 (Ren *et al*, 2006)、罗非鱼 (Huang *et al*, 2007) 和黑鲷 (Yang *et al*, 2007) 中也发现存在 hepcidin 多变体现象。

1.2 hepcidin 体内表达特性的研究

在哺乳动物中, hepcidin主要在成年动物的肝中表达, 在肝中hepcidin mRNA是最丰富的mRNA之一。Hepcidin在肝中的表达被严格的限定于肝实质细胞, 并且依赖于肝实质细胞的分化状态。在心脏和脑中也检测到了hepcidin的表达, 但是量要少得多。除此之外, 在EST数据库中还发现hepcidin在肺、睾丸、胃和胰腺中也有表达, 但是尚未研究这些器官、组织中hepcidin的功能。在啮齿动物中, hepcidin基因表达具有时间特异性, hepcidin mRNA在胚胎末期无法检测到, 在出生时含量上升, 只有在成年后才达到最高水平。值得注意的是, 鼠中hepcidin基

因表达高度的依赖于遗传背景 (Nicolas *et al*, 2002; Courselaud *et al*, 2004)。对人和鼠的研究发现: 在炎症状态下, 组织中的hepcidin的合成量会增多, 体外试验推测hepcidin可能是一类II型急相反应物 (Nemeth *et al*, 2003)。

杂交斑纹鲈鱼的hepcidin成熟肽虽然是从鳃中分离到, 但检测到hepcidin-mRNA的量在肝中最多, 并且hepcidin-mRNA的转录水平可被鱼的病原体诱导大幅度上升。Shike *et al* (2002) 在检测鲈鱼hepcidin在各器官、组织中不同表达水平时发现, 在受到某种鱼类致病菌(*S. iniae*)感染后, 白鲈鱼肝脏组织的hepcidin基因的表达能够被诱导增多4500倍, 而在其它组织中hepcidin基因的表达仍保持较低的水平。因此推测此肽极可能是在肝脏中合成, 之后通过循环系统运送到鱼体各组织器官发挥作用。在人体中也出现类似的情况: hepcidin从尿液和血浆超滤液中分离到, 但在肝中表达量最多, 心脏和脑都很低。

Douglus *et al* (2002) 通过对几种海水鱼EST数据库和dbEST数据库的序列的详尽查找, 发现了二十二条以前还未被证实的类似hepcidin的序列。分别来自牙鲆, 青鲙, 美洲鲈和大西洋鲑鱼。在检测美洲黄盖鲈各器官、组织(肝、卵、胃、小肠、脾和幽门盲肠)的EST数据库时, 发现类似hepcidin序列仅在脾和肝中检测到; 同样, 在检测现大西洋鲑鱼的EST数据库过程中, 也只有肝脏和脾脏的EST数据库到类似hepcidin的序列。同时, 在大西洋鲑鱼的脾和肝的差减cDNA文库中(受病原菌*Aeromonas salmonicida*感染与正常差减), 也发现了类似hepcidin的序列, 说明在脾脏和肝脏中, 类似hepcidin序列的转录水平受到病原菌的诱导, 表现出上调趋势。

1.3 hepcidin 的抗菌功能的研究

Hepcidin 被认为是一个在C末端富含8个半胱氨酸残基的保守肽家族, 不同生物来源的hepcidin有着同样的组成: 信号肽、优势域和成熟肽; 但在成熟肽结构域其氨基酸序列组成, 不同生物和品种间又都存在较显著差异。已报道在高等哺乳动物中, hepcidin 既是一种具有广谱的抗革兰氏阳性和阴性细菌、真菌的抗菌多肽, 炎症和感染等均可诱导hepcidin的合成和分泌; 同时hepcidin又是一种机体铁代谢平衡的重要激素, 该基因的表达与遗传性血色病、慢性贫血病等铁代谢相关性疾病具有密切的相关性。

2000年, Krause *et al*最早从人类的血浆发现hepcidin时, 曾用化学合成的多肽检测了hepcidin的抗菌活性。结果发现hepcidin能够剂量依赖性(Dose-dependent)的抑制革兰氏阳性菌藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和革兰氏阴性菌灰色奈瑟球菌(*Neisseria cinerea*)的生长, 但是对大肠杆菌(*E. coli* BL21 G⁻)和荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens* G⁻)没有活性, 此hepcidin对枯草芽孢杆菌的半数抑制浓度(half-maximal inhibitory activity, IC₅₀)为40μg/ml(14.4 μM)。对人hepcidin成熟肽片段进行质谱分析, 发现其中含有8个由四个分子内二硫键连接的Cys, 这几对Cys围在阳离子片段周围, 匀称的排列, 类似于antimicrobial protegrins 和tachyplesins, 有两列二硫键稳固的β-折叠结构, 基于这些, 他们认为其Cys的连接模型为1-4, 2-8, 3-7, 5-6。二硫键的这种排列显示可能有3个β-转角及侧链中至少带一个位阻的折叠现象。

人尿中分离出来的hepcidin成熟肽包含有20、22和25个氨基酸多肽三种组成形式, 相对分子质量介于2000~3000Da之间。正常pH值情况下, 这些多肽带有正电荷。20和25个氨基酸多肽是hepcidin的主要存在形式。Hep20和Hepc25的天然产物, 在30μM浓度下对大肠杆菌(*E. coli* ML35P G⁻)的生长则具有较强的抑制作用, 对金色葡萄球菌和表皮葡萄球菌等革兰氏阳性菌的生长抑制作用较弱, 对绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa* G⁺)没有抑制作用(Park *et al*, 2001)。Hep20和Hepc25的C末端都保留了半胱氨酸形成的富集区, 区别仅在于氨基末端被切掉的氨基酸数目不同, CD光谱学特性研究证实, 在磷酸缓冲液中hepcidin具有两个稳定的β折叠结构, 这一结构与抗菌多肽的胱氨酸结(cystineknot)结构非常相似。Hunter *et al* (2002)进一步研究了人hepc-20和hepc-25在溶液中的构像, 发现两个肽都形成一个扭曲的β-折叠和一个loop, 在发夹环的部位有一个非常邻近的二硫键, 但是hepc-20在溶液中呈单体状态, 而hepc-25呈聚集状态, 这可能是导致两种肽活性不同的原因。

2002年 Shiker 等从杂交斑纹鲈鱼分离到的 hepcidin 成熟肽, 是人 hepcidin 的同族体, 对大肠杆菌具有抗菌活性。细菌感染可诱导鲈鱼体内显著表达 hepcidin, 表明其在天然免疫的快速反应期发挥着重要的抗菌功能。细菌的 LPS 在体内、体外均可诱导 hepcidin 基因在鼠肝细胞中表达, 表明 hepcidin 既有抗

菌功能又有铁代谢相关的其它功能,在两种不相关的病理生理状态下均可被诱导表达,但 hepcidin 的抗菌活性与抑制铁吸收的这两种看似互不相干的功能是否有必然的联系,尚无充分的实验证据证明。人们对 hepcidin 抗菌机制的研究不是很多,只是推测 hepcidin 的提高可能是宿主的防御策略,即限制入侵的微生物或恶性细胞对重要的铁的需要。而真正要弄清 hepcidin 不同于其他抗菌肽的特性以及功能上是否具有相关性,需要首先分别阐明 hepcidin 基因在细菌感染与铁过量等两种不同病理下的调控机制,阐明相关调控机制才能清楚地解释其生物过程。该方面的研究目前仅见于 hepcidin 基因表达与铁过量的关系,而与细菌感染相关的 hepcidin 基因的调控机制未见报道。

2. 本研究目的和意义

科学界普遍认为,在不久的将来现有抗生素因耐药性的提高将对细菌感染无效,即使现在耐药性较低的万古霉素也不例外。已趋向认同的观点是未来应优先考虑发展替代药物或者发现抗微生物的天然物质,以找到可持续、有效控制病原性疾病的新途径。目前国际医学界将抗菌肽看作是未来最有前途的耐药性抗生素的有效替代品。因此研究抗菌肽具有重要的科学意义和应用价值,已预见到抗菌肽作为一类独特的天然免疫活性物质,在医学、农业、药学等领域都将具有广泛的应用价值。

与人、鼠等高等脊椎动物相比,在鱼类中,hepcidin 基因存在着多个基因变体。王克坚教授课题组在前期研究工作中,从我国海水养殖黑鲷中已分离到 7 个 hepcidin 基因变体,其中肝脏分离到 3 个基因变体,脾脏、皮肤、鳃、血细胞等分离到 4 个基因变体;前期 RT-PCR 和 Northern-blot 结果还显示:hepcidin mRNA 的总转录水平在肝脏、脾脏、皮肤、鳃和血细胞中有明显的差别;相似的结果也见于 Douglas 等的研究报道。这些结果与人、鼠 hepcidin 抗菌肽的表达特点有很大差别。鱼类的特异性免疫系统进化程度较低,因此在病原微生物感染的早期,hepcidin 很可能只是作为一种抗菌肽发挥其非特异性免疫因子的作用抵御有害微生物的感染及有毒物质的侵蚀,或者各个 hepcidin 的基因变体在不同的组织器官中可能发挥不同的功能,如铁代谢调节功能等,这些都是需要急待解决的基本问题。本研究论文选择黑鲷 hepcidin 基因的两个基因变体 AS-hepc2

和 AS-hepc6 展开实验, 这两个基因变体分别来源于黑鲷的不同器官、组织, 实验中同时检测 AS-hepc2 和 AS-hepc6 基因变体在黑鲷健康状态和细菌感染状态下的表达时间性、空间性和表达方式的不同, 为阐明黑鲷 hepcidin 不同基因变体的生物学意义、深入研究鱼类 hepcidin 的非特异性免疫机制奠定基础。

从鲈鱼中分离到的 hepcidin 成熟肽在体外实验中表现出抑制微生物生长的能力。利用原核表达系统重组表达的人类 hepcidin 融合蛋白, 也能够抑制细菌的生长。由于 hepcidin 的特殊的二硫键结构, 通过体外合成或从动物体直接分离纯化的方法, 成本都较高, 且后者过程复杂。而借助目前比较成熟的基因工程技术建立 hepcidin 基因的表达载体, 筛选 hepcidin 高效表达菌株, 能够获得大量 hepcidin 抗菌肽重组蛋白。本研究论文分别构建了黑鲷 AS-hepc2 和 AS-hepc6 基因原核表达载体, 表达和纯化融合蛋白, 并检测两个基因变体编码蛋白的抗菌谱和抗菌活性。利用基因工程技术建立 hepcidin 基因的高效表达载体, 研究其基因表达产物的抗菌活性, 可为将来开发利用海水养殖鱼类的抗菌肽, 研制新型的可替代抗生素的有效抗耐药性细菌药物或饲料免疫添加剂等提供科学依据。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库